

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Versuche zur Darstellung der Haptoglobintypen durch Acrylamidgel-Elektrophorese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Peter Schaible

aus Heilbronn

Marburg 1967

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Versuche zur Darstellung der Haptoglobintypen durch Acrylamidgel-Elektrophorese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Peter Schaible

aus Heilbronn

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 19.12.67

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Correferent: Prof. Dr. med. G.G. Wendt

INHALT

	Seite
Aufgabe und Fragestellung	7
A. Acrylamid	7
1. Chemie	7
2. Katalysatorsysteme	9
3. Die Polymerisation	10
4. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Gels . .	11
B. Polyacrylamidgel-Elektrophorese in horizontaler	
Versuchsanordnung	15
1. Das Verfahren von BAUMGARTEN	15
2. Das Verfahren von GERVAIS und VIESCOU	16
3. Eigene Ergebnisse mit den Methoden von GERVAIS- VIESCOU und BAUMGARTEN	17
4. Eigene Modifikationen der horizontalen Versuchsanordnung	18
I. Verbesserung der Stromüberleitung mit Filterkarton	18
II. Verbesserung der Stromüberleitung durch direktes Eintauchen des Gels in den Puffer	19
III. Versuche, das Gel zu kühlen	19
IV. Versuche, die Austrocknung des Gels zu verhindern	20
V. Versuche, das Reißen des Gels am Impf= schlitz zu verhindern	20
VI. Ergebnisse dieser Veränderungen	21
C. Polyacrylamidgel-Elektrophorese in vertikalen	
Glasröhren	22
1. Begründung des eigenen Verfahrens	22
2. Versuche zur Entwicklung einer entsprechenden Versuchsanordnung	23
I. Die Wahl der Rohrgröße	23
II. Die Wahl des Puffers	25
III. Die Wahl der Stromstärke	26

3. Die erste gelungene Versuchsanordnung und ihre Technik	27
4. Ermittlung der für die Haptoglobinauftrennung günstigsten Porengröße	30
5. Ermittlung der günstigsten Laufzeit	31
6. Versuche zur Anfärbung der Haptoglobulinbanden und zur Konservierung der gefärbten Typenbilder . .	33
7. Die Empfindlichkeit des Nachweises	34
D. Die endgültig entwickelte Apparatur	35
1. Die Glasröhren	35
2. Der Kathodenaufsatz	35
3. Das Anodengefäß	36
4. Die Elektroden	36
5. Die Färbeschale	36
E. Das entwickelte Verfahren	40
1. Der Puffer	40
2. Die Gelzubereitung	40
3. Das Füllen der Röhren	41
4. Die Vorbereitung der Apparatur zur Elektrophorese	43
5. Die Elektrophorese	44
6. Das Auspressen der Gelsäulen	44
7. Das Färben	45
F. Anwendung des entwickelten Verfahrens zur Blutfleckendiagnostik	47
1. Herstellung der Flecken	47
2. Die verschiedenen Verfahren der Literatur	47
I. Nach DÜRWARD	47
II. Nach HEIFER	47
III. Nach CULLIFORD	48
IV. Nach CULLIFORD und WRAXALL	48
V. Nach GERVAIS und VIESCOU	48
VI. Nach VOGEL	49
VII. Nach HALLERMANN und STÜRNER	49
VIII. Nach MOLNAR	49

	5
IX. Nach FIORI und MARIGO	50
X. Nach FALK und BUNDSCHUH	50
3. Eigene Modifikation des Aufbereitungsverfahrens	50
4. Versuche mit Gelsäulen diskontinuierlicher Porengröße	51
G. Zusammenfassung	53
H. Literatur	54

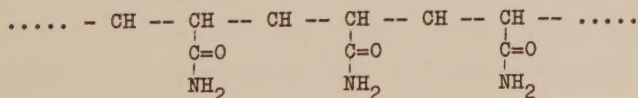
Aufgabe und Fragestellung

Die ursprünglich gestellte Aufgabe war, die Verwendbarkeit neuer Trägermedien wie Zelluloseacetatfolien und Polyacrylamidgel zur Haptoglobin-Diagnostik aus Blutflecken zu untersuchen. Die Versuche mit Zelluloseacetat wurden wegen des hohen Preises des Materials und wegen der nur geringen, strukturell bedingten, dem Papier ähnlichen Auftrennungsfähigkeit fallengelassen. Da sich aber bei den Versuchen mit Polyacrylamidgel ganz neue und überraschende Auftrennungsmöglichkeiten zeigten, befaßt sich der Hauptteil der vorliegenden Arbeit mit der Entwicklung eines Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Verfahrens zur Haptoglobin-Routinediagnostik aus Blutseren. Die Frage der Haptoglobindarstellung aus Blutflecken mit Hilfe des Polyacrylamidgels wird nur am Schluß noch kurz behandelt.

A. Acrylamid

1. Chemie

Acrylamid (AA) ist in seinen Reaktionsmöglichkeiten durch eine Säureamidgruppe und eine durch diese aktivierte Doppelbindung gekennzeichnet. Die Substanz selbst gibt mechanisch einigermassen feste Gele erst ab einer Konzentration von etwa 18%. Die AA-Moleküle sind hier in Form von Ketten angeordnet:



Die Transparenz und Konsistenz des Gels ist vom Verhältnis AA : MBA abhängig. Sinkt der MBA-Gehalt unter 1,5% (bezogen auf AA), so wird das Gel klebrig. Steigt er dagegen auf über 4%, so wird es trübe und zunehmend brüchiger, d.h. der Wert X in Abb. 1 darf 25 nicht unterschreiten. Ein wasserklares und elastisches Gel erhält man bei einem AA-Gehalt von etwa 5% und einer auf diesen bezogenen MBA-Konzentration von etwa 3%. Erhöht man die AA-Konzentration auf über 10% bei gleichbleibend niedrigem MBA-Gehalt, so wird das Gel ebenfalls brüchig und starr.

Das von "CYANAMID Comp." vertriebene Produkt CYANO GUM 41 ist eine gebrauchsfertige Mischung von AA und MBA. Der MBA-Gehalt dürfte, der Opaleszenz nach zu urteilen, bei etwa 4-5% liegen.

2. Katalysatorsysteme

Zur Reaktion von AA mit MBA ist ein Katalysator nötig. Folgende Systeme sind bekannt (CYANAMID Comp., Prospekt "CYANO GUM 41"): $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ + 8-dimethylaminopropionitril (DMAPN), $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ + DMAPN, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + H_2O_2 , AgNO_3 + $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 10% AEROSOL-OT oder TRITON-X-100 + POROPHOR-N, 10% AEROSOL-OT + Di-t-butyl-peroxyd, Ferroammonsulfatexahydrat + H_2O_2 . Auch Photopolymerisation mit Riboflavin ist möglich.

Zu den hier beschriebenen Versuchen wurde das Redoxsystem $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ + DMAPN benutzt.

3. Die Polymerisation

Die Polymerisationszeit ist stark abhängig von einer Reihe Faktoren, läßt sich aber bei entsprechenden Maßnahmen durch die Konzentration des Katalysatorsystems lenken. Eine hohe Konzentration wirkt beschleunigend, eine niedrige verlangsamen.

Verlängernd auf die Polymerisationszeit wirken: Kälte, niedriger pH, fein verteilte Stoffe, Cu^{++} , Fe^{+++} , Messing, Luftsauerstoff. Inhibierend wirken Hydrochinon und NaNO_2 sowie Fe^{+++} und Luftsauerstoff in genügend hoher Konzentration. Die verzögernde oder bei entsprechend geringer Katalysatorkonzentration inhibitorische Wirkung von Luftsauerstoff kann aufgehoben werden, wenn man die Reaktion in CO_2 oder N_2 -Atmosphäre ablaufen läßt. Weniger aufwendig ist es, das Reaktionsgefäß mit einer Platte oder noch besser mit einer Folie abzudecken. Um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden, wird das Gefäß zu diesem Zwecke so weit gefüllt, daß der Flüssigkeitsspiegel die Ebene des Gefäßrandes konvex überragt und dann mit einer zuvor unter heißem Wasser knitterfrei gemachten Kunststofffolie vorsichtig überdeckt. Die nach dieser Methode hergestellten Geloberflächen sind nahezu vollkommen eben.

Verkürzend auf die Polymerisationszeit wirken: Wärme und erhöhte Konzentration der Monomeren.

Bei Zimmertemperatur erhält man ein fertiges Gel bei einer Katalysatorkonzentration von 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ + 0,1% DMAPN im wäßrigen Monomerengemisch nach etwa 25-30 min. Verwendet man je 0,4% des Redoxsystems, so ist das Gel schon nach 3-5 min gebrauchsfertig.

4. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Gels

WHITE stellte bei seinen Permeabilitätsmessungen fest, daß die durchschnittliche Porengröße des Gels von der Konzentration der Monomerenmischung abhängig ist und daß diese Porengröße im Bereich von 20 Teilen AA : 1 Teil MBA bis zu 40 Teilen AA : 1 Teil MBA speziell auf der Konzentration des AA beruht. In diesem Konzentrationsbereich und Konzentrationsverhältnis ist also für die Form der Poren weitgehend die Tertiärstruktur der PAA-Ketten verantwortlich. Andere Arbeiten (JONGKIND und Mitarb.) sprechen dem MBA-Gehalt einen größeren Einfluß zu. Es ist jedoch anzunehmen, daß er stark von der Molekülgröße und Molekülform der jeweils untersuchten Substanz abhängig ist, da WHITE mit Wasser und Salzlösungen arbeitete, JONGKIND und Mitarb. zu ihrem Ergebnis jedoch an Hand von Elektrophoreseversuchen mit mehr oder weniger hochmolekularen Proteinen kamen. ORNSTEIN sowie RAYMOND und NAKAMICHI sind der Ansicht, daß der Vernetzer nur eine stabilisierende Funktion ausübt und ohne Einfluß auf die Porengröße ist.

Durch Wahl der entsprechenden AA-Konzentration läßt sich fast jede beliebige Porengröße zwischen etwa 5 und 60 Å einstellen. Man kann also einen gezielten sog. "barrier effect" (nach BERMES und McDONALD, zit. nach BIEL und Mitarb.) erreichen, d.h. eine hinsichtlich der elektrischen Ladung homogene Proteinfraktion, wird bei Anpassung der Porendurchmesser an die Molekülgröße durch die Abhängigkeit der Wanderungsstrecke geladener Teilchen in gelartigen Trägern von ihrer Größe, Form und Struktur in mehr oder weniger Unterfraktionen aufgetrennt. Da bei einem Porendurchmesser, der größer ist als der Durch-

messer des hindurchtretenden Moleküls, Diffusionserscheinungen auftreten, muß die Porengröße so gewählt werden, daß sie kleiner als der doppelte Molekylradius ist. Nach RAYMOND und WEINTRAUB wird der reine Siebeffekt noch dadurch abgeschwächt, daß die Proteinmoleküle im elektrischen Feld etwas deformiert werden.

Dieser Molekularsiebeffekt ist im Prinzip allen gelartigen Trägern zu eigen. SMITHIES hatte schon 1955 die bessere Auftrennungsfähigkeit des Stärkegels gegenüber dem Papier auf diesen Siebeffekt zurückgeführt. In einfacher und reproduzierbarer Weise variieren und gezielt anwenden läßt er sich aber nur beim PAA-Gel. Durch seine geringe, nahezu ganz fehlende ionische Aufladung entfällt auch die elektroosmotische Gegenströmung während der Elektrophorese.

Die von WHITE experimentell gefundene Abhängigkeit der Porengröße des PAA-Gels von der AA-Konzentration läßt sich durch die Kurve der Abb. 2 darstellen. ORNSTEIN berechnete an Hand eines stark vereinfachten Modells und unter weitgehender Vernachlässigung der "crosslinks" die Porendurchmesser und kam zu einem etwas anderen Ergebnis.

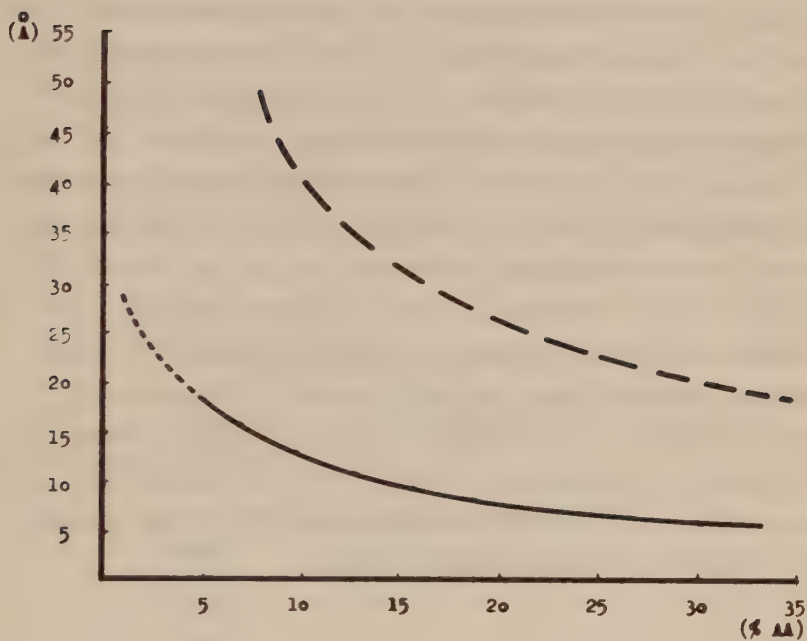
Unter der Annahme, daß elektrophoretisch bewegte Proteine im Gel Teilchen gleichen, die in einem viskösen Medium in eine gleichförmige Bewegung geraten, wendet OTT auf die PAA-Gelelektrophorese das Stoke'sche Gesetz an:

$$K = 6\pi \mu v r \quad (1)$$

dabei ist K die dem Teilchen vom Medium entgegengesetzte Kraft, μ die Viskosität des Mediums, v die Geschwindigkeit des Teilchens und r sein Radius. Vereinfacht besagt die Gleichung

Abb. 2. Abhängigkeit der Porengröße in $\text{\AA}$ von der AA-Konzentration in %. Den Werten nach WHITE liegt ein Gel mit 5% MBA, bezogen auf AA, zugrunde.

WHITE: ————— ORNSTEIN: - - - - -



chung, daß die jeweils zurückgelegte Strecke umgekehrt proportional dem Radius der Teilchen ist. Also:

$$\frac{L_1}{L_2} = \frac{r_2}{r_1} \quad (2)$$

wobei L die Wanderungsstrecke im Gel und r der Radius der Teilchen ist. Verdoppelt sich nun das Volumen eines Teilchens, so vergrößert sich sein Radius um $\sqrt[3]{2}$, und seine Wanderungsstrecke wird um denselben Faktor kleiner.

Da das Stoke'sche Gesetz streng genommen nur für kugelförmige Teilchen gilt, die sich in einem zähen, kontinuierlichen Medium ohne Wirbelbildung fortbewegen, ist es nur bedingt auf Proteinmoleküle übertragbar, was die Teilchen anbelangt. Die viskösen Eigenschaften eines Gels und einer Lösung sehr langkettiger Polymerer sind dagegen dieselben. Trotzdem konnte OTT am Beispiel der Haptoglobine zeigen, daß, unter Annahme der Banden I, II, III usw. als Mono-, Di-, Tetrameren usw. beim Typ 2-1 bzw. 2-2, die Wanderungsstrecken mit den errechneten Werten weitgehend übereinstimmten.

B. Polyacrylamidgel-Elektrophorese in horizontaler Versuchsanordnung

Zu Beginn der hier beschriebenen Versuche lagen als Arbeitsgrundlage nur die Arbeiten von BAUMGARTEN und von GERVAIS-VIESCOU vor. Da diese daher als Ausgangspunkt für die weiteren Versuche anzusehen sind, seien sie kurz geschildert.

Für sämtliche Versuche wurden in der üblichen Weise (s. PROKOP und BUNDSCHUH) hergestellte Serum-Hämoglobinemischungen von 9 : 1 benützt. Als Elektroden dienten bei den horizontalen Versuchsanordnungen 5 x 5 cm große Platten aus 0,3 cm starkem Bleiblech.

1. Das Verfahren von BAUMGARTEN

Die zur Polymerisation fertige Monomerenmischung hat folgende Zusammensetzung:

AM 9 (wohl identisch mit CYANOGLUM 41)	7,5 g
DMAFN	0,5 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,5 g
Wasser	ad 100 ml

Die Mischung wird 0,15 cm hoch über Objektträger gegossen, die in einer Schale ausgelegt sind. Zum Polymerisieren deckt man die Schale mit einer "Perspex"-Platte (wohl ein Kunststoff) ab. Nach 4 min ist das Gel fertig. Man schneidet es mit einer Rasierklinge entlang den Objektträgern heraus und legt je 12 der mit Gel behafteten Träger in 500 ml einer Pufferlösung folgender Zusammensetzung:

Tris	9,2 g
Citronensäure	1,0 g
Wasser	ad 200 ml

Nach 6 Stunden wird die Pufferlösung erneuert, und nach weiteren 12 Stunden sind die Gele gebrauchsfertig. Sie können bis zur Verwendung im Puffer liegenbleiben.

In 1,5 cm vom Gelende entfernte Rasierklingenschnitte werden die Serumproben mit Hilfe von entsprechend zugeschnittenen Zelluloseacetatfolien oder Whatman No.1-Papier eingebracht. Der Autor gibt die Menge von 0,1 μ l Serum als genügend an. Die Verbindung mit dem Elektrodenpuffer (Boratlupuffer 0,0115 m, pH 8,9) wird durch Filterpapier hergestellt. Nach einer Laufzeit von 30 min bei 20 V/cm wird in folgender Lösung gefärbt:

Gesättigte Lösung von o-Dianisidin in Äthanol	20 ml
Äthanol	40 ml
Acetatpuffer (pH 4,6/2,7 m)	20 ml
Wasser	60 ml

Nach 10 min wird 2% Perhydrol zugesetzt. Die Färbung ist nach weiteren 10 min beendet, und die Gele werden für 30 min in Wasser gelegt.

2. Das Verfahren von GERVAIS und VIESCOU

Aus dem Verfahren, das die Autoren zur Blutfleckendiagnostik entwickelt haben, sollen hier nur Gelzubereitung, Elektrophorese und Färbung besprochen werden. Die Fleckenaufbereitung wird später noch beschrieben.

Die zur Polymerisation fertige Monomerenmischung hat folgende Zusammensetzung:

CYANOGLUM 41, 30% Lösung	16,6 ml
Gelpuffer	66,4 ml
DMAPN	0,4 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 2,5%ige Lösung	16,6 ml

Das Gel ist 2-3 mm dick und 5 cm lang zu gießen. Die Impfschlitze werden beim Gießen ausgespart. Als Gelpuffer dient ein 0,03 m Boratpuffer vom pH 8,9, als Elektrodenpuffer ein 0,3 m Boratpuffer vom pH 8,4. Die Überleitung vom Elektrodenpuffer zum Gel geschieht mit Hilfe von Elektrophoresepapier. Die Elektrophorese selbst dauert 4-5 Stunden bei einer Spannung von 30 V/cm. Darnach wird das Gel in ein Färbebad folgender Zusammensetzung gelegt:

Benzidinlösung 1%
in 10% Essigsäure
dazu 0,4% Perhydrol

3. Eigene Ergebnisse mit den Methoden von BAUMGARTEN und GERVAIS-VIESCOU

Alle Versuche wurden mit CYANOGLUM 41 gemacht. Die in den Arbeiten angegebenen Feldstärken konnten in keinem Fall erreicht werden, da (1) der zur Verfügung stehende Gleichrichter-Transformator mit einer Kapazität von 600 V/180 mA nicht ausreichte und (2) das Gel sich bei einer angewandten Klemmenspannung von z.B. 500 V, was eine Feldstärke von 6 V/cm ergab, schon so stark erwärmte, daß es sinnlos schien, die Stromstärke noch weiter zu steigern. Die Elektrophoresen konnten also nur bei wesentlich geringeren Feldstärken vorgenommen werden; z.B. nach BAUMGARTEN 8 V/cm über 7 Stunden und nach GERVAIS-VIESCOU 6 V/cm über 4 Stunden. Die Auftrennungen waren mäßig.

Nach der Technik von BAUMGARTEN ergaben sich 3 Banden (Typ 2-1), nach GERVAIS-VIESCOU 2 diffuse Banden (Typ 2-1).

4. Eigene Modifikationen der horizontalen Versuchsanordnung

In der Hoffnung, durch eine geeignetere Versuchsanordnung bessere Ergebnisse erzielen zu können, wurden mehrere Veränderungen vorgenommen. Um die Dicke der Gelplatten beliebig variieren zu können, wurden mit Hilfe von 1 cm breiten und verschiedenen dicken Glasstreifen, die auf Glasplatten geklebt worden waren, Gießwannen verschiedenster Tiefe hergestellt.

I. Verbesserung der Stromüberleitung mit Filterkarton

Um den enormen Stromstärke- und Spannungsabfall zwischen Elektrodenpuffer und Gel etwas zu mindern, wurde ein besonders saugfähiges Papier zur Überleitung genommen (Schleicher & Schüll No. 2668). Es wurde in mehreren Schichten verwendet. Der beste Erfolg wurde erreicht, wenn eine Schicht vor Zugabe, die zweite Schicht nach Eingießen der Polymerisationsmischung, aber noch bevor die Gelierung einsetzte, in die Gießwanne gelegt wurde, so daß beide Papierlagen sich vollsaugten und dann, mit der Gelplatte zwischen sich, einpolymerisierten.

II. Verbesserung der Stromüberleitung durch direktes Eintauchen des Gels in den Puffer

Da der Spannungsabfall **nach** der unter (I) beschriebenen Maßnahme zwar etwas abnahm, jedoch noch immer sehr beträchtlich war, wurde das Gel über eine Brücke aus Polyäthylen in Form eines Halbzylinders gelegt. Der Halbzylinder war aus einer Polyäthylenflasche herausgeschnitten worden und stand mit je einer Längskante in einem Puffergefäß. Um das Kriechen von Puffer zwischen Gel und Brücke zu verhindern, wurde etwa 1 cm oberhalb des Pufferspiegels je ein 0,2 cm breiter Streifen aus der Brücke herausgeschnitten. Das Gel tauchte 0,3 cm tief in den Puffer ein. Der Spannungsabfall betrug nur noch etwa 60%.

III. Versuche, das Gel zu kühlen

Die gute Luftisolation und der aus dieser resultierende Wärmestau am Gel bedingt, daß es selbst durch Einstellen der Apparatur in den Kühlschrank während des Laufes nur unvollkommen gelingt, die Joule'sche Wärme abzuführen. Daher wurde als Brücke eine Polyäthylenflasche gewählt, deren Boden exzentrisch durchbohrt und mit einem Gummistopfen samt Glasrohr versehen worden war. Die Flasche sollte als gekühlte Gelunterlage dienen. Die Kühlflüssigkeit floß durch die normale Flaschenöffnung ein und über die am Boden exzentrisch angebrachte Öffnung ab. Das Gel wurde über den zylindrischen Flaschenteil gelegt und tauchte auf beiden Seiten direkt in den Puffer ein. Da als Kühlflüssigkeit nur Leitungswasser benützt wurde, war das Ergebnis kaum besser als bei Kühlschrankkühlung. Bessere Resultate

tate wären wohl zu erzielen gewesen, wenn das Kühlsystem an einen Kryostaten angeschlossen worden wäre.

IV. Versuche, die Austrocknung des Gels zu verhindern

Die Geloberfläche wurde mit einer Plastikfolie bedeckt, und zwar derart, daß zwischen Überleitungspapier oder Pufferspiegel - bei direktem Eintauchen - ein 0,2 cm breiter Zwischenraum blieb, der das Kriechen des Puffers zwischen Gel und Folie verhindern sollte. Auch das Überleitungspapier wurde mit Folie abgedeckt, und zwar auf der Ober- und auf der Unterseite. Dadurch wurde erreicht, daß sich das Papier noch stärker vollsaugen konnte. Die Abdeckung ermöglichte Läufe von über 24 Stunden Dauer, ohne daß das Gel die geringsten Austrocknungserscheinungen zeigte.

V. Versuche, das Reißen des Gels am Impfschlitz zu verhindern

Nachdem die Impfpapiere etwa 30 min nach Elektrophoresebeginn entfernt worden waren, wurde in den Impfschlitz schnellpolymerisierende Monomerenmischung gegossen, so daß nach dem Gelieren wieder eine durchgehende Gelplatte entstand.

Nicht ganz so gut waren die Ergebnisse, wenn der Impfschlitz zusammengepreßt und mit einer Plastikfolie überdeckt wurde, die den Schlitz dann zusammenhielt.

VI. Ergebnisse dieser Veränderungen

Die Elektrophoreseergebnisse waren im ganzen gesehen etwas besser. So konnten jetzt bei beiden Verfahren 4-5 Banden dargestellt werden. Befriedigend waren die Ergebnisse aber noch nicht, da die Qualität der Typenbilder selten die der üblichen Stärkegel-Elektrophorese erreichte.

C. Polyacrylamidgel-Elektrophorese
in vertikalen Glasröhren

1. Begründung des eigenen Verfahrens

Es hat sich bei den oben beschriebenen Versuchen mit Gelplatten gezeigt, daß der Erfolg der Elektrophorese bei gegebenen Pufferbedingungen fast immer von der Lösung folgender Probleme abhängig ist:

- (a) Gel-Puffer-Kontakt
- (b) Erwärmung des Gels während des Laufes
- (c) Wasserverdunstung durch Erwärmung.

Bei der Suche nach anderen, geschlossenen Gelträgern bot sich als einfaches Mittel die Glasröhre an.

ad a) Mit Hilfe von Schläuchen wäre sehr leicht ein optimaler Kontakt zwischen Gel und Puffer zu erreichen.

ad b) Durch Überschieben eines zweiten, weiteren Glasrohres wäre eine wirksame Kühlung in Form eines Liebigkühlers möglich. Da bei einem Leiter II. Klasse der elektrische Widerstand der Erwärmung umgekehrt proportional ist, würde die normalerweise bei Erwärmung nötige Stromstärkenenerhöhung nach

$$U = R \times I \quad (3)$$

wegfallen oder doch geringer sein, wodurch die Joule'schen Wärmekalorien nach

$$Q = 0,239 \times I^2 \times R \times t \quad (4)$$

nicht durch hohe Stromstärken provoziert würden, die sich in der 2. Potenz auswirken.

ad c) Durch direkten Kontakt des Gels mit dem Puffer einerseits und dem umgebenden Glasrohr andererseits wäre das Gel hinsichtlich der Wasserverdunstung ein in sich abgeschlossenes System. Der Wasserverlust am Gel durch Joule'sche Wärme würde wegfallen. Die Wasserverschiebung durch hydratisierte Ionen ist dadurch natürlich nicht zu beeinflussen.

2. Versuche zur Entwicklung einer entsprechenden Versuchsanordnung

I. Die Wahl der Rohrgröße

Es wurde versucht, die zur Auftrennung einer Serumprobe im Plattenverfahren benötigte Gelmenge (im günstigsten Falle etwa 3 ml) möglichst zu unter-, keinesfalls zu überschreiten. Mit der Verringerung der Gelmenge sollte erreicht werden, daß (1) bei gleicher Serumeingabe die Banden kompakter und daher besser sichtbar würden und (2) sich der elektrische Widerstand des Leiters vergrößerte. Bei einem Leiter I. Klasse ist

$$R = \frac{l \times \varrho}{F} \quad (5)$$

Das heißt, der Widerstand R ist der Länge l des Leiters direkt und dem Querschnitt F umgekehrt proportional. ϱ ist der materialspezifische Widerstand.

Im Prinzip liegen bei Ionenleitern die gleichen Verhältnisse vor:

$$R = \frac{U}{N \times e \times F \times (v_- + v_+)} \quad (6)$$

Es ist: U = Spannung, N = Anzahl der Ladungen, e = deren Ladungseinheit, F = Querschnitt des Leiters, v_- oder v_+ =

Wanderungsgeschwindigkeit der negativen oder positiven Ionen.
Da das elektrische Feld

$$E = \frac{U}{l} \quad (7)$$

ist, wobei l = Abstand der Elektroden bedeutet, ergibt sich für

$$R = \frac{l \times E}{N \times e \times F (v_- + v_+)} \quad (8)$$

Das heißt auf das Elektrophoreseproblem übertragen: Der Widerstand R der Gelsäule ist ihrer Länge l und der Feldstärke E direkt, dem Querschnitt F des Gels, der Art und Konzentration des Puffers, dargestellt durch den Ausdruck $N \times e \times F(v_- + v_+)$, umgekehrt proportional. Nach dem Ohm'schen Gesetz $U = R \times I$ läßt sich mit einem großen Widerstand bei geringer Stromstärke eine hohe Spannung erzielen. Da die Pufferzusammensetzung und -konzentration nicht verändert werden sollte, kamen als einzige variable Größen die Länge l der Gelsäule und ihr Querschnitt F in Frage.

Wie sich aber bald zeigte, waren den Röhrengößen insofern Grenzen gesetzt, als das Gel aus einem sehr langen und engen Rohr durch seine im Verhältnis zu seinem Volumen große Adhäsionskraft nur sehr schwer als unbeschädigte Säule zu entfernen war. So mußte der Plan, Rohrdurchmesser von 0,2-0,3 cm bei einer Gellänge von 10-15 cm zu benutzen - was dann, (wie sich später zeigte) Läufe von 20-30 min erlaubt hätte - fallengelassen werden zu Gunsten des Kompromisses: unbeschädigte, aber relativ dicke Gelsäule, daraus resultierende relativ geringe Spannung und daraus sich ergebende relativ lange Laufzeit. Als Maßstab bei der Rohrauswahl wurde die Möglichkeit der Gewinnung

einer unbeschädigten Gelsäule genommen. Nach einer Reihe von Versuchen zeigte sich eine Röhre von 12-15 cm Länge und etwa 0,4-0,6 cm lichter Weite als geeignet. Das Gel nahm bei einer Säulenhöhe von ungefähr 10 cm ein Volumen von etwa 2-2,5 ml ein.

II. Die Wahl des Puffers

Beim Verfahren nach BAUMGARTEN wird das Gel mit reinem Wasser angesetzt. Der Puffer diffundiert dann ein. Diese Methode ließ sich nicht auf das Röhrenverfahren übertragen, da die Gelsäulen, nachdem sie einige Zeit im Puffer gelegen hatten, sich nicht mehr unbeschädigt in die Röhren reponieren ließen. Versuche, die leicht gequollenen Säulen durch kurzes Einlegen in absolutes Äthanol etwas zu entwässern, also leicht schrumpfen zu lassen, in die Röhre zu reponieren und dann das Puffergleichgewicht durch Einlegen in Puffer wiederherzustellen, erwiesen sich als zwecklos, da beim Entwässern mit Alkohol geringe Mengen der Puffersalze auf dem Gel ausfielen und durch das nachfolgende Einlegen in Puffer nicht mehr in Lösung zu bringen waren. Wie sich bei Versuchen im Gelplatten-Verfahren zeigte, war es auch nicht möglich, das Gel direkt mit Puffer anzusetzen und das gewünschte Puffergleichgewicht durch Einlegen in Wasser sich einstellen zu lassen, da hierzu genaue Analysen der Pufferbäder nötig gewesen wären, was aber zu umständlich und zu zeitraubend erschien.

Da nach GERVAIS-VIESCOU das Gel direkt mit Puffer angesetzt wird und Versuche mit diesem Puffersystem in den Röhren auch gute Ergebnisse brachten, erübrigte es sich, das BAUMGARTEN-Verfahren weiterzubearbeiten.

III. Die Wahl der Stromstärke

In einer Reihe von Elektrophoreseläufen wurde diejenige Stromstärke ermittelt, bei der die Joule'sche Wärme mit der sich daraus ergebenden lokalen Konzentrationsverschiebung im Puffer, die Gelsäule nicht zum Einschnüren und Reißen brachte.

Da sich während des Laufes die Stromstärke weniger verändert als die Spannung - die Spannung steigt bis zur Mitte des Laufes etwas an und bleibt dann konstant oder sinkt langsam ab, ohne den Ausgangswert wieder zu erreichen - und die Stromstärke auch von der Zahl der Röhren abhängig ist, erwies es sich als zweckmäßig, die Stromstärke als Richtgröße zu benutzen.

Als oberste Grenze für die gewählte Größe der Gelsäulen wurde eine Stromstärke von 7-8 mA ermittelt. Da die Joule'sche Erwärmung nach Gl. 4 hier schon sehr beträchtlich ist, wurde der Lauf im Kühlschrank vorgenommen, wobei der $+3^{\circ}\text{C}$ kalte Anodenpuffer die Glasröhren in fast ihrer ganzen Länge bedeckte. Die Laufzeit betrug 50 min.

Stromstärken ab 5 mA und weniger erlauben es, den Versuch auch bei Zimmertemperatur ablaufen zu lassen. Bei 3 mA liegen die Werte z.B. folgendermaßen: 60 V, ansteigend im Verlauf von etwa 1,5 Stunden auf etwa 90 V und dann langsam wieder abfallend. Laufzeit 3,5 Stunden. Bei 5 mA: 80 V, ansteigend innerhalb 1 Stunde auf 110-120 V, dann abfallend auf etwa 100 V. Laufzeit 2 Stunden.

3. Die erste gelungene Versuchsanordnung und ihre Technik

Der ursprüngliche Plan, die Röhre mittels Schlauchverbindung an die Puffergefäße anzuschließen, wurde fallengelassen, da sich (1) der apparative Aufwand als zu groß erwies und (2) die Röhren senkrecht stehen mußten, damit nicht Spiegelbildungen des Puffers zwischen Gel und Rohr auftraten.

Um gleichzeitig mehrere Serumproben zur Elektrophorese bringen zu können, wurde ein Gummistopfen von 5 cm Durchmesser waagrecht halbiert und eine Hälfte mit 5 Bohrungen versehen, von denen eine im Zentrum lag, und die 4 andern symmetrisch um diese herum angeordnet waren. Durch die mittlere Bohrung wurde ein Glasrohr soweit geschoben, daß es den Stopfen nach beiden Seiten um 6 cm überragte. Durch dieses Rohr wurde die Zuleitung zur Anode gelegt. Die 4 anderen Bohrungen nahmen 4, 10 cm hoch mit Gel gefüllte Glasröhren auf. Eine Weithalspräparateflasche aus Hostalen wurde 10 cm unterhalb ihres Schraubgewindes abgeschnitten und mit der Schrauböffnung nach unten über den mit den Glasröhren versehenen Gummistopfen geschoben. Die dadurch entstandene Schale, die nach oben offen war und deren Boden der Stopfen mit den Röhren bildete, diente als Kathodenpuffergefäß. Bei den Versuchen in horizontaler Versuchsanordnung mit Gelplatten hatte sich gezeigt, daß die Bleielektroden während der Elektrophorese stark mit dem Puffer reagierten und auch V2A-Stahlelektroden nicht ganz korrosionsbeständig waren. Daher wurden bei den Versuchen mit Röhren Platinelektroden benutzt. Die Kathode, ein 0,6 mm starker Platindraht, wurde mit einer Krokodilklemme am Rand des oben be-

schriebenen Kathodenpuffergefäßes festgeklemt. Die Anodenenden der Röhren standen in einem mit Elektrodenpuffer gefüllten Glas und wurden über eine ebenfalls 0,6 mm starke Platindrahtanode, die in der Mitte des Anodenpuffergefäßes eintauchte, an den Stromkreis angeschlossen.

Die Röhren wurden - durch Aufsaugen der Monomerenmischung und Festhalten mit Schlauch und Schlauchklemme bis zur Beendigung der Polymerisation - gefüllt. Da dies sehr umständlich war und sich in großem Maßstab schlecht machen ließ, wurden sie später am Unterende mit Gummistopfen verschlossen, und die Polymerisationslösung wurde mit einer Pipette von oben eingefüllt. Der Nachteil dieser Methode war aber, daß nach der Gelierung das Stopfenvolumen von Gel ausgespart war und beim Eintauchen in den Puffer der Gel-Puffer-Kontakt durch eine Luftblase behindert wurde. Eine bessere Lösung war dann, die Röhren vor Zugabe der Monomerenmischung am Unterende mit Heftpflaster zu verkleben.

Die Serumproben wurden zuerst mit Hilfe eines passenden Filterpapierstückchens in die Röhre und auf das Gel gebracht. Da während der Elektrophorese aber die Gefahr bestand, daß die Seren in den Puffer diffundierten und sich untereinander vermischten, mindestens aber den Kathodenpuffer zum Schäumen brachten, wurde das Serum später direkt auf das Gel getropft und mit einer geringen, noch nachträglich zugegebenen Monomerenmenge fixiert.

Besondere Schwierigkeiten bereitete das Entfernen der Gelsäule aus dem Glasrohr, ohne das Gel zu verletzen. Versuche, die Gelsäule mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in eine zwischengeschaltete, mit Wasser gefüllte Waschflasche zu saugen,

schlugen fehl, da der Sog im entscheidenden Augenblick nicht fein genug regulierbar war oder auch überhaupt nicht ausreichte. Am besten bewährte es sich, die Säule mit einem feinen Draht von beiden Enden her 1-2 cm hoch zu umfahren, wobei streng darauf zu achten ist, daß die Gelsäule nicht angeritzt wird. Mit einer Rekordspritze, die über ein Schlauchstück angeschlossen war, wurde das Gel dann in eine mit Wasser gefüllte Schale herausgedrückt, da es sich von dort wieder leicht aufnehmen läßt.

Versuche, die Röhren zu siliconisieren, führten nicht weiter, da die Glaswandung dann so hydrophob ist, daß sich sehr leicht Luft einschließen zwischen Glas und Gel bilden, die sich bei Erwärmung des Gels während des Laufes ausdehnen und eine Einschnürung oder gar ein Reißen des Gels verursachen können. Genauso erfolglos waren Versuche, die Rohrrinnenwand mit einem Paraffin- oder Vaselinefilm zu überziehen, der dann vor dem Auspressen durch Eintauchen der Röhre in warmes Wasser zum Schmelzen gebracht wurde und als Schmierfilm beim Herausgleiten dienen sollte.

Gefärbt wurden die Gelsäulen mit der von GERVAIS und VIESCOU angegebenen Färbelösung. Die Einwirkungszeit des Benzidins wurde allerdings auf 15-20 min verlängert, und erst danach wurde das Perhydrol zugegeben. Die Färbung wurde in einer transparenten Schale vorgenommen, in der die Gele dann auch gleich über einer Lichtquelle diagnostiziert werden konnten (s. unten).

4. Ermittlung der für die Haptoglobine= auftrennung günstigsten Porengröße

Um den Einfluß des MBA-Gehaltes auf die Auftrennungsfähigkeit des PAA-Gels für die Haptoglobine festzustellen, wurden die Versuche nicht mehr mit CYANOGLUM 41 gemacht. Es wurden AA-MBA-Mischungen von 5% AA und (auf dieses bezogen) 3-5% MBA in Abständen von 0,25% MBA angesetzt. Da das Gel bei weniger als 2,5% MBA-Gehalt klebrig wird und dadurch noch schlechter aus den Röhren zu entfernen ist, wurde ein MBA-Gehalt von 3% als untere Grenze angenommen. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß in dem untersuchten Bereich der Einfluß des MBA-Gehaltes auf die Auftrennung zu vernachlässigen ist. Da 5% MBA, bezogen auf AA, dem Gel eine für das Röhrenverfahren günstige Zähigkeit und Elastizität geben und die durch den MBA-Gehalt bedingte Opaleszenz bei der Auswertung nicht stört, wurden 5% MBA für alle weiteren Versuche als Standardwert genommen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Gele mit 3-9% AA bei konstanter Stromstärke und Laufzeit (5 mA / 2,5 h) untersucht. Die Auftrennung ist bei einer hohen AA-Konzentration sehr scharf. Die Wanderungsstrecke und damit die Zahl der sichtbaren Banden sind aber sehr gering. Bei niedriger AA-Konzentration ist die Wanderungsstrecke und die Zahl der sichtbaren Banden groß, die Banden selbst sind jedoch rautenförmig verbreitert und werden mit steigendem Porendurchmesser mehr und mehr diffus.

Die optimale Polymerkonzentration hinsichtlich der Wanderungsstrecke und der Zahl und Schärfe der Banden bei einer Stromstärke von 5 mA und einer Laufzeit von 2,5 Stunden sind 5,5% AA und darauf bezogen 5% MBA.

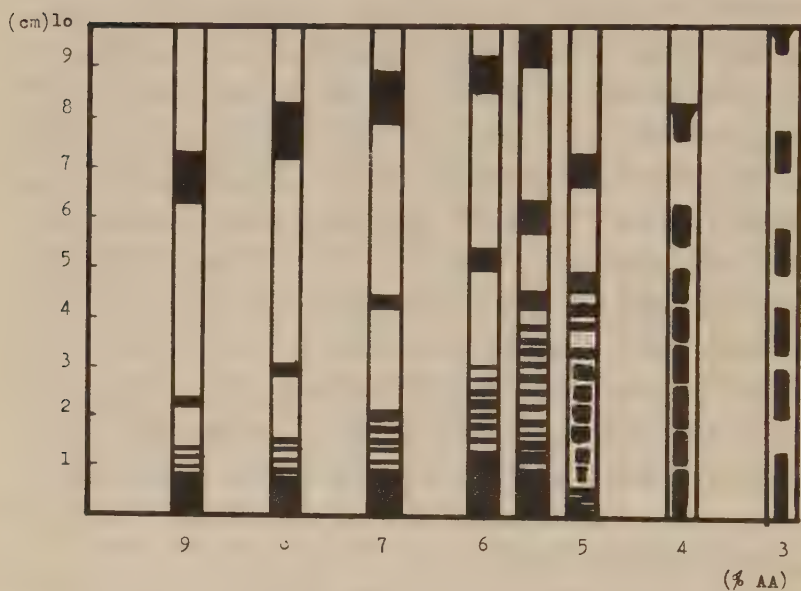
5. Ermittlung der günstigsten Laufzeit

Es wurde die Laufzeit bei konstanter Stromstärke und Polymerkonzentration (5,5% AA, 5% MBA, 5 mA) von 1 bis 9 Stunden variiert. Wie aus Abb. 3 zu sehen ist, die Läufe von 2,5 Stunden Dauer zeigt, wandert die Hämoglobinbande in dieser Zeit bis zum Anodenende der Gelsäule, so daß sie nötigenfalls als Anhaltspunkt bei der Identifizierung der Haptoglobinbanden dienen kann. Nach 6,5-7 Stunden ist Hp 1-1 zum Anodenende des Gels gewandert. Bande I von Hp 2-1 liegt knapp davor. Die anderen Banden sind über das Gel verteilt, mit einer starken Häufung am Kathodenende. Die am weitesten gewanderten Banden sind etwas verbreitert. Insgesamt waren bei Hp 2-1, wie bei Hp 2-2, 10 - 11, gelegentlich beim Typ 2-1 sogar bis zu 13 Banden zu zählen. Eine Abhängigkeit der Zahl der sichtbaren Banden von der Laufzeit wurde zwischen 2,5-7 Stunden nicht festgestellt. Es sind also bei 2,5stündigen genau so viele Banden zu zählen wie nach 7stündigen Läufen.

Das auf der Kathodenseite liegende Bandenpaket konnte weder bei 7stündiger noch bei 9stündiger Laufzeit ganz aufgetrennt werden. Es war nach 9 Stunden insgesamt etwas zur Anode hin gewandert. Auch geringere AA-Konzentrationen, also größere Porendurchmesser, erbrachten keine bessere Auftrennung dieses Pakets.

Preßt man die Gelsäulen zwischen zwei Glasplatten, z.B. Objektträgern, so sind alle Banden etwas deutlicher zu erkennen, da sie etwas auseinanderweichen und die ringförmig angefärbten Zonen zu schmalen Ovalen zusammengepreßt werden, wodurch sie farbstoffreicher erscheinen. In dem kathodenwärts

Abb. 3. Die Wanderungsstrecke des Hp-Types 2-1 in Abhängigkeit von der AA-Konzentration bei konstanter Laufzeit und Stromstärke (2,5 h / 5 mA)



gelegenen Bandenpaket sind auf diese Weise noch 2-3 Banden auszumachen.

6. Versuche zur Anfärbung der Haptoglobulinbanden und zur Konservierung der gefärbten Typenbilder

Von den möglichen spezifischen Peroxydasefärbungen mit Benzidin, o-Tolidin, o-Dianisidin, Toluidin, Leukomalachitgrün wurden nur die Benzidin- und o-Dianisidinfärbung geprüft. Gefärbt wurde nach den von BAUMGARTEN und GERVAIS-VIESCOU angegebenen Vorschriften. Die Einwirkungszeit des o-Dianisidins und des Benzidins wurde jedoch auf 15-20 min verlängert, da die ringförmig gefärbte Zone im Gel mit steigender Einwirkungszeit scheibenförmig wird. Nach PROKOP und BUNDSCHUH ist die o-Dianisidinfärbung im Stärkegel empfindlicher. Wie sich aber zeigte, waren die mit Benzidin gefärbten Banden im transparenten PAA-Gel kontrastreicher und damit besser zu erkennen. Von Nachteil ist natürlich, daß die Zonen nur während 3-5 min optimal ausgebildet sind und die Färbung daher überwacht werden muß.

Wie bei der Färbung im Stärkegel ist auch hier eine Konservierung mit Naphtholgelb-S möglich. Sie wird jedoch - im Gegensatz zum Stärkegel - erst nach der Färbung vorgenommen. Die verbleibenden Bilder haben nicht dieselbe Qualität wie im Stärkegel, da sich die Gelsäule mit einem dünnen, trüben Film, wohl ausgefälltem Farbstoff, überzieht.

7. Die Empfindlichkeit des Nachweises

Als gerade noch notwendige Serummengen wurden für Hp 1-1 $1,0\mu\text{l}$ und für Hp 2-1 und Hp 2-2 je $1,5\mu\text{l}$ ermittelt.

Durch Verringerung der Gelmenge wurde versucht, eine noch größere Empfindlichkeit zu erreichen. In einem 0,5 cm weiten Glasrohr wurde ein 0,3 cm starker Glasstab konzentrisch fixiert und der Zwischenraum dann mit Gel ausgegossen. Nach der Elektrophorese wurde der Glasstab vorsichtig herausgezogen und der Gelzylinder in der Röhre gefärbt. Da es jedoch sehr schwierig war, eine ebene Geloberfläche zum Auftragen des Serums zu erhalten, und bei unebener Geloberfläche die Banden stark verzerrt waren, wurden diese Versuche nicht fortgesetzt.

D. Die endgültig entwickelte Apparatur

1. Die Glasröhren

Präzisionsglasröhren, 13 cm lang und 0,5 cm weit, in 10,5 cm Höhe mit einer Marke und einer Nummer versehen. Zum Verschluss der Röhren dienen Serumstopfen, in deren zylindrischen Verschlussenteil die Röhren gesteckt werden.

2. Der Kathodenaufsatz

Ein zylindrisches, 12 cm weites und 3 cm tiefes Gefäß aus Trovidur (Hersteller: H. Kniese, Marbach bei Marburg). Der Boden enthält in konzentrischer Anordnung zwei Reihen von insgesamt 16, 1,0 cm weiten, leicht konischen Bohrungen, in welche von unten her durchbohrte Gummistopfen eingedreht sind, die die Röhren aufnehmen. Durch die Mitte des Bodens führt ein 0,5 cm weites Trovidurrohr, das den Boden nach oben und unten um je 6 cm überragt. Es enthält an jedem Ende eine Steckbuchse und umschließt die Zuleitung zur Anode. Unten wird die Anode und oben die Anodenzuleitung vom Gleichrichtergerät eingesteckt. In der Seitenwand des Aufsatzes ist in 2 cm Höhe eine Durchsteckbuchse eingeschraubt, in die von außen die Zuleitung vom Gleichrichter und von innen die Kathode eingesteckt wird. Der Aufsatz ist durch einen 0,2 cm tiefen und 0,5 cm breiten Falz an der Unterseite des Bodens in den Oberrand des Anodengefäßes eingelassen.

3. Das Anodengefäß

Ein zylindrisches, 13 cm tiefes und 10 cm weites Standgefäß aus Glas, das mit einem eingeschliffenen Deckel verschlossen werden kann, um zu verhindern, daß Puffer verdunstet, wenn das Gerät nicht in Betrieb ist.

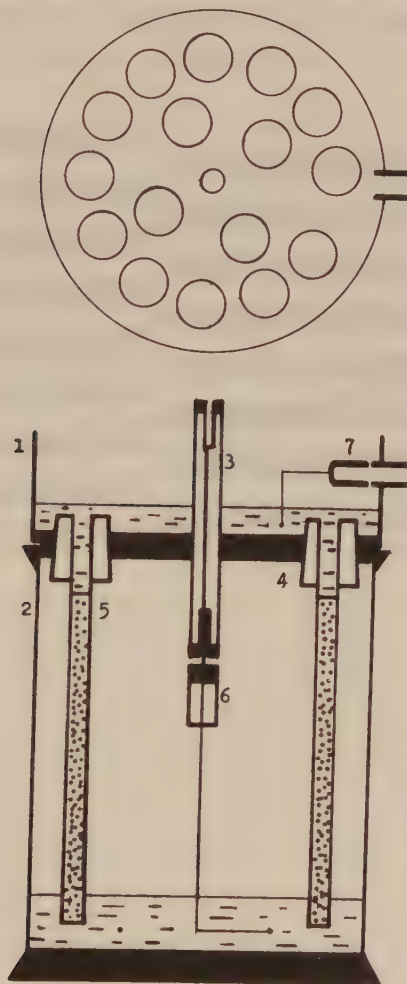
4. Die Elektroden

0,6 cm starke Platindrähte, die zur Erreichung einer gleichmäßigen Feldstärke kreisförmig zwischen äußere und innere Röhrenreihe gelegt werden. Damit sie beim Ein- und Ausbauen der Röhren nicht behindern, werden sie erst nach dem Einschieben der Röhren mit Hilfe von Bananensteckern in die oben beschriebenen Steckbuchsen gesteckt und vor dem Entfernen der Röhren wieder abgezogen.

5. Die Färbeschale

Die Schale ist 21,6 x 11 x 2 cm groß. (Hersteller: H. Wege, Cölbe bei Marburg.) Der Boden besteht aus Plexiglas. Auf den Boden sind untereinander, im Abstand von 0,7 cm, 11 cm lange Stege von quadratischem Querschnitt und 0,7 cm Kantenlänge geklebt, und zwar derart, daß die Stege der einen Schalenhälfte genau vor den Zwischenräumen der anderen stehen. In diese Zwischenräume werden die Gelsäulen gelegt. Der Abstand der Stege der einen Schalenhälfte von denen der andern, sowie der Abstand zwischen Kopfende der Stege und seitlicher Schalenwand beträgt 0,2 cm. Jeder Steg ist auf der Oberseite mit 10 0,1 cm

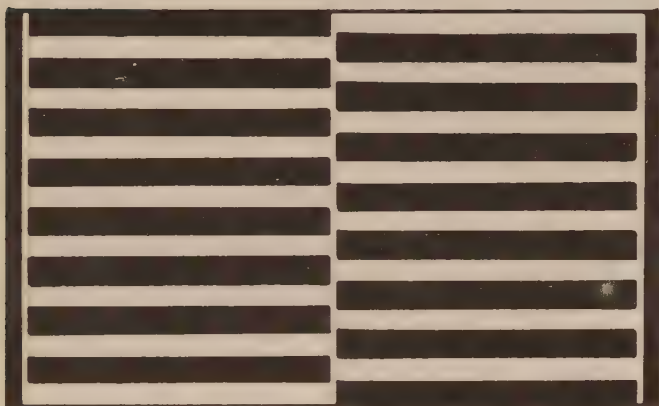
Abb. 4. Die Elektrophoreseapparatur in Draufsicht und Aufriß.
 Die einzelnen Teile sind: 1 = Kathodenaufsatz,
 2 = Anodengefäß, 3 = Trovidurrohr mit Anodenzuleitung,
 4 = durchbohrte Gummistopfen, 5 = Glasrohr mit Gel,
 6 = Anode, 7 = Kathode



breiten und 0,3 cm tiefen Kerben versehen. Stege und Wandung sind aus schwarzem Trovidur. Auf der Oberseite der beiden Seitenwände ist jeder der für die Gelsäulen bestimmten Schlitz mit einer eingeschlagenen Zahl nummeriert.

In die Schale ist ein Deckel aus Plexiglas mit einem allseitigen Spielraum von 0,1 cm eingepaßt. Er liegt auf den Stegen auf und hat über jedem Schlitz 8 0,3 cm weite Bohrungen.

Abb. 5. Die Färbeschale in Aufriß und Aufsicht



E. Das entwickelte Verfahren

1. Der Puffer

Als Gelpuffer dient ein 0,03 m Na-boratpuffer vom pH 8,9-9,0, als Elektrodenpuffer ein 0,3 m Na-boratpuffer vom pH 8,4-8,5. Der Anodenpuffer wird für 2-3 Läufe verwendet, dann empfiehlt es sich, ihn auszuwechseln. Durch inzwischen hineingewandertes Protein schäumt er dann mehr oder weniger stark. Der Kathodenpuffer kann nach jedem Lauf zum Anodenpuffer gegossen werden.

2. Die Gelzubereitung

Die zur Polymerisation fertige Mischung hat folgende Zusammensetzung:

AA	5,5 g
MBA	0,27 g
DMAFN	0,1 g = 0,118 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,1 g
Gelpuffer	94 ml

Um die Gelzubereitung zu vereinfachen, werden AA, MBA und $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in größeren, einander äquivalenten Mengen angesetzt, für den obigen Ansatz etwa:

AA	5,5 g + 31,3 ml Gelpuffer
MBA	0,27 g + 31,3 ml "
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,1 g + 31,3 ml Gelpuffer

Die Persulfatlösung ist im Kühlschrank aufzubewahren, zer setzt sich aber selbst bei dieser Temperatur im Verlauf von etwa 3-4 Wochen, so daß man sie am besten regelmäßig nach etwa 3 Wochen wieder frisch ansetzt.

Gleiche Mengen der Vorratslösungen werden in der Reihen-

folge AA, MBA, DMAPN (unverdünnt), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in ein Becherglas pipettiert und durch Umschwenken gemischt. Die jeweils nötige Menge DMAPN errechnet sich nach: ml Persulfatlösung $\times 0,00318 \times 1,18 = \text{ml DMAPN}$. Dabei ist 0,00318 der Umrechnungsfaktor und 1,18 die Korrektur für die Dichte des DMAPN. Die Lösung polymerisiert bei Zimmertemperatur im Verlauf von etwa 20-30 min.

Für das schnell - in 3-5 min - polymerisierende Verschußgel wird dieselbe AA- und MBA-Lösung benutzt. Die Persulfatlösung hat aber folgende Zusammensetzung:

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,4 g + 31,0 ml Gelpuffer

Die entsprechende DMAPN-Menge errechnet sich dann nach der vorstehenden Gleichung mit dem Faktor 0,0128.

Durch Mischen des hochprozentigen mit dem niederprozentigen Katalysatorgemisch im Verhältnis 1:1 läßt sich eine Polymerisationszeit von etwa 10 min einstellen.

3. Das Füllen der Röhren

Die Röhren werden am unteren Ende mit Serumstopfen verschlossen und in einem Reagensglasgestell senkrecht aufgestellt. Die Monomerenmischung wird mit einer spitz ausgezogenen Pipette bis zur Marke eingefüllt. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Luftbläschen an der Röhrenwand hängen bleiben.

Sind alle Röhren gefüllt, so werden in jedes Rohr noch 2 Tropfen Wasser auf die Monomerenmischung getropft, damit sich eine möglichst waagerechte Geloberfläche ausbildet. Werden sehr schnell polymerisierende Mischungen verwendet, so erübrigt sich die Wasserzugabe, die Geloberfläche wird automatisch eben.

Das Ende der Polymerisation ist an einer leichten Opaleszenz des Gels zu bemerken. Die über dem Gel stehende Flüssigkeit wird abgegossen. Mit einer Pipette werden 0,02 ml der Serum-Hämoglobinmischung direkt auf das Gel getropft und 2 Tropfen der schnell polymerisierenden Monomerenmischung zugegeben. Die Röhren werden wieder senkrecht gestellt, und nach 3-5 min ist das Verschlussgel fest. Man kann dies prüfen, indem man es aus einer Röhre auszukippen versucht, sieht es aber auch an der Phasentrennlinie Gel - überstehende Flüssigkeit, die sich bei der Polymerisation ausbildet. Die überstehende Flüssigkeit - es handelt sich hier um nichtpolymerisierte Monomerenmischung - wird wieder abgegossen.

Bei Zugabe der Verschlussgel-Monomerenmischung ist darauf zu achten, daß diese sich durch das zuvor eingefüllte Serum nicht zu sehr verdünnt, da sie sonst nicht mehr polymerisiert. Bei dem oben angegebenen Verhältnis 0,02 ml Serum : 2 Tr. Monomerenmischung besteht diese Gefahr nicht.

Die mit Gel gefüllten Röhren können - an beiden Enden verschlossen - längere Zeit aufbewahrt und bei Bedarf dann benützt werden. Sollte das Gel dann ausnahmsweise einmal Austrocknungserscheinungen, also Einziehungen an einer der beiden Säulenden, zeigen, so legt man die offene Röhre vor Gebrauch kurze Zeit in Gelpufferlösung, worauf das Gel wieder quillt. Das etwas zeitraubende Ansetzen neuen Gels zu jedem Lauf läßt sich auf diese Weise vermeiden.

4. Die Vorbereitung der Apparatur zur Elektrophorese

Damit beim Entfernen der Serumstopfen von den Röhren kein Sog auf das Gel ausgeübt wird, werden die Stopfen von den Röhren vorsichtig abgekippt. Mit dem Verschlußgel voran werden sie dann so weit in die durchbohrten Gummistopfen des Kathodenaufsatzes eingedreht, bis sie mit dem Stopfenende bündig sind. Falls nicht alle Bohrungen besetzt werden, verschließt man die noch offenen mit passenden Gummistopfen.

Die Anode wird eingesteckt, und in das Anodengefäß wird soviel Puffer eingefüllt, daß die Röhren nach Aufsetzen des Kathodenaufsatzes etwa 0,5 cm tief eintauchen. Bei dem oben beschriebenen Gefäß braucht man hierfür etwa 100 ml. Sollte der Kontakt zwischen Gel und Puffer bei der einen oder anderen Röhre durch eine Luftblase behindert sein, so kann man diese durch Schütteln des Puffers oder schnelles Drehen des Kathodenaufsatzes entfernen.

Um den Einschluß von Luftblasen am Kathodenende der Röhren zu vermeiden, wird mit einer Pipette in jede Röhre auf das Verschlußgel Elektrodenpuffer bis zum Überlaufen gegeben. Das Kathodengefäß wird dann soweit mit Puffer gefüllt, daß die Stopfen ganz bedeckt sind.

Nachdem die Kathode eingesteckt worden ist, wird sie samt der Anode mit dem Gleichstromgerät verbunden und die Apparatur zum Lauf in den Kühlschrank gestellt.

5. Die Elektrophoresè

Stromstärken von 5 mA pro Röhre lassen sich ohne jedes Risiko anwenden, für 16 Röhren also 80 mA. Die Spannung beträgt zu Anfang etwa 60-80 V, steigt im Laufe von etwa 1 Stunde auf 110-120 V an, bleibt dann konstant oder fällt wieder leicht ab. Da sich die Stromstärke während des Spannungsanstiegs auch etwas verändert, muß sie in dieser Zeit kontrolliert werden. Die Laufzeit beträgt 2,5 Stunden. Die Hämoglobinbande ist dann ganz an das Anodenende des Gels gewandert.

Durch Einstecken von kleinen Gummistopfen, die mit einer feinen Bohrung versehen sind, in die Kathodenenden der Röhren, können, wenn nötig, Röhren von der weiteren Elektrophorese ausgeschaltet werden, ohne daß der Lauf der anderen unterbrochen wird. Die Stromstärke ist dann um die entsprechende Ampèrezahl zu erniedrigen.

6. Das Auspressen der Gelsäulen

Nachdem der Kathodenpuffer abgeschüttet ist, werden die Röhren herausgedreht und die Gelsäulen mit einer feinen, aber nicht zu dünnen Nadel an beiden Enden zwischen Gel und Rohrwandung etwa 1-2 cm hoch umfahren. Es ist dabei streng darauf zu achten, daß die Geloberfläche nicht verletzt wird, da sonst die Gefahr besteht, daß das Gel beim Herauspressen durch das Wasser aufgewühlt wird. Ist das Gel auf diese Weise gelockert, so wird die Röhre über ein Schlauchstück an eine mit Wasser gefüllte Rekordspritze angeschlossen und das Gel dann vorsichtig in eine mit Wasser gefüllte Schale herausgedrückt. Das Verschußgel fällt dabei meistens ab. Ist dies nicht der Fall, so

quetscht man es mit einem Spatel weg, da die Säule sonst im Schlitz der Färbeschale nicht genügend Spielraum hat. Jedes Gel kommt in den Schlitz entsprechender Nummer, und zwar derart, daß das Kathodenende des Gels zur nummerierten Schalenwand hinzeigt.

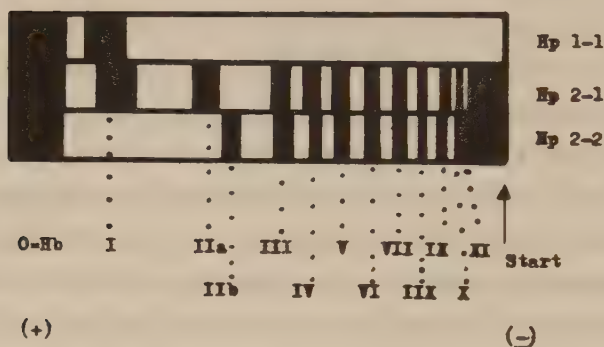
7. Das Färben

Die Färbelösung: In 10% Essigsäure wird 1% Benzidin unter Schütteln und leichtem Erwärmen im Wasserbad gelöst.

Liegen in sämtlichen Schlitzten der Schale Gelsäulen, so benötigt man 50 ml dieser Lösung, um alle Säulen zu bedecken. Unter gelegentlichem Hin- und Herschwenken der Schale läßt man die Lösung 15-20 min lang einwirken. Dann fügt man 0,1-0,2 ml Perhydrol (also 0,2-0,4%) hinzu. Die Schale wird auf einem Lichtkasten leicht hin- und herbewegt, so daß sich das Peroxid gleichmäßig verteilt. Nach 1-2 min werden die Banden nach und nach sichtbar. Nach etwa 3 min wird die Schale mit aufgepreßtem Deckel unter fließendem Wasser ausgespült.

Zum Diagnostizieren der Typen wird die Schale dann mit dem Gel auf die Lichtquelle gestellt. Da nur die Schlitzte erleuchtet sind, lassen sich auch schwach ausgebildete Banden gut erkennen.

Abb. 6. Die Lage der Banden der 3 Hp-Typen zueinander nach einem Lauf unter Standardbedingungen (5,5% AA / 5% MBA, 5 mA / 2,5 h). Bezeichnung der einzelnen Banden nach PROKOP und BUNDSCHUH.



F. Anwendung des entwickelten Verfahrens zur Blutfleckendiagnostik

1. Herstellung der Flecken

Frischblut der 3 Typen wurde auf Halbleinenstoff getropft, so daß das Material vollständig durchtränkt war. Die Stofflappen wurden aufgehängt und bei Zimmertemperatur getrocknet.

2. Die verschiedenen Verfahren der Literatur

I. Nach DÜRWARD

Die Trockenblutspur wird in verdünnter Hämoglobinlösung aufgelöst und das Eluat mit Hilfe eines Filterpapierstreifens eingeeengt. Der direkt unter der maximalen Verfärbung liegende Streifenteil wird herausgeschnitten, mit Wasser angefeuchtet und nach Verimpfen der Stärkegelelektrophorese unterworfen.

II. Nach HEIFER

Das Fleckeneluat wird eingeeengt und auf Filterpapierstreifen aufgenommen. Nach Hämoglobinzusatz werden die Streifen zur Stärkegelelektrophorese verimpft.

MÜNSCHER arbeitete nach dieser Methode und nach der von VOGEL (s. unten) und fand dieselbe Nachweisbarkeitsgrenze für die verschiedenen Typen hinsichtlich des Alters der Flecken (etwa 2 Wochen).

III. Nach CULLIFORD.

Der Fleck wird in Tris-Puffer eingeweicht und für 1-2 Stunden in eine feuchte Kammer gebracht. Anschließend wird er direkt verimpft und der Stärkegelelektrophorese unterworfen. Angefärbt wird mit Amidoschwarz 10 B.

IV. Nach CULLIFORD und WRAXALL

Es handelt sich im Prinzip um ein Verfahren, wie es von HALLERMANN, KIWI und STÜRNER zur Hp-Diagnostik aus Seren entwickelt wurde:

In einer Stärkegelelektrophorese bei pH 6,5 wird das überschüssige Hämoglobin abgetrennt, das bei diesem pH zur Kathode hin wandert. Das anodenwärts liegende, die Haptoglobine enthaltende Gel wird herausgeschnitten und zur Immunelektrophorese in Agargel mit Anti-Hp-Serum gebracht. Die Autoren konnten bis zu 3 Monate alte Flecken sicher diagnostizieren.

V. Nach GERVAIS und VIESCOU

Der Fleck wird mit Wasser gelöst und das Eluat in einer Polyäthylenkapillare zentrifugiert. Nach Abtrennen der Stomata wird die überstehende Flüssigkeit in die Gelreservoirs des Polyacrylamidgels gefüllt und zur Elektrophorese gebracht. Der Nachweis gelingt in bis zu 14 Tage alten Flecken.

Abb. 6a. Die Färbeschale mit den gefärbten Gelen.



Abb. 6b. Die gefärbten Gelsäulen mit den Hp-Typen
2-1, 2-2, 2-1, 2-1, 2-2, 1-1. (von oben nach
unten)



VI. Nach VOGEL

Der Fleck wird in Wasser gelöst und mit Hämoglobinlösung versetzt. Dann kommt das Gemisch für 2 Stunden in den Kühlschrank und wird anschließend im Wasserbad auf $1/5$ seines Volumens eingeeengt. Das Konzentrat wird der Papierelektrophorese unterworfen. Die angefärbten Zonen werden herausgeschnitten, in Gelpuffer gelöst, mit Hämoglobinlösung versetzt, mit Filterpapier aufgenommen und der Stärkegelelektrophorese unterworfen. 3 Wochen alte Spuren sind noch zu identifizieren.

VII. Nach HALLERMANN und STÜRNER

Nach elektrophoretischer Behandlung der Spur im Agargel wie zur Gc-Bestimmung wird Neugeborenen Serum in den Antikörperkanal gefüllt, der Ansatz für 40 min bei 37° belassen und der Kanal mit Antimensch Serum beschickt. Dann wird gefärbt wie bei der Gc-Bestimmung. Es entstehen Präzipitate, die nur auf Haptoglobin zu beziehen sind, da alle anderen Antikörperfraktionen durch Neugeborenen Serum abgesättigt sind. Dieses ist in 90% der Fälle noch haptoglobinfrei (PROKOP und BUNDSCHUH).

VIII. Nach MOLNAR

Der Verfasser untersuchte Blutflecken nach der Methode von SMITHIES, die er etwas modifizierte. Er konnte noch nach 2 Wochen Hp 1-1 und Hp 2-2 einwandfrei nachweisen. Nach 2 Monaten gelang die Identifizierung nur noch in 70% der Proben.

IX. Nach FIORI und MARIGO

Die Verfasser versuchten mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese die Haptoglobine in Blutflecken nachzuweisen. Dies gelang ihnen jedoch nur bei frisch getrockneten Flecken. Bei älteren Flecken sollte nach Meinung der Verfasser der Identifizierungsversuch nur gemacht werden, wenn genügend Fleckenmaterial zur Verfügung steht.

X. Nach FALK und BUNDSCHUH

Die Verfasser untersuchten die Möglichkeit des Hp-Nachweises aus Blutspuren mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese und einem diskontinuierlichen Boratpuffersystem. Bei Fleckenmaterial aus Textilien benötigten sie mehrere cm^2 große Proben. Der eindeutige Nachweis der Haptoglobintypen gelang selten.

3. Eigene Modifikation des Aufbereitungsverfahrens

2 x 2 cm große Flecken wurden kleingeschnitten und in Wasser eingeweicht. Nach 1 Stunde wurde das Eluat abgepreßt und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines 8 x 1 cm großen Filtrierpapierstreifens eingengt. Sehr hartes Papier, z.B. Schleicher & Schüll No. 2045 a oder b, eignet sich besonders gut.

Aus dem Streifen wurde direkt unter dem Hämoglobin ein 1 cm langes Stück herausgetrennt, kleingeschnitten und in eine Röhre auf das Gel gefüllt. Nach Übergießen mit Puffer und 1/2-stündigem Einweichen wurde die Elektrophorese vorgenommen.

Von 40 untersuchten, bis zu 16 Tage alten Proben konnten auf diese Weise bei 32 Proben Haptoglobinkomplexen nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit der Nachweisbarkeit vom Alter der Flecken wurde nicht festgestellt. Eine Differenzierung der Typen 2-1 und 2-2 war jedoch nicht möglich, da sich in den meisten Fällen nur die Banden I, IIa, III, IV, V darstellten (s. S. 46).

Um den Aufbereitungsvorgang zu vereinfachen, wurde in einer anderen Versuchsreihe das Flecken-Stoffmaterial, nachdem es kleingeschnitten worden war, direkt in die Röhren auf das Gel gefüllt und nach 1/2stündigem Einweichen mit Puffer der Elektrophorese unterworfen. Trotz der erheblich höheren Wanderungsgeschwindigkeit des Hämoglobins im PAA-Gel wurden aber die vielleicht vorhandenen Hp-Banden durch das über seine Laufstrecke etwas verschmierte Hämoglobin überdeckt.

4. Versuche mit Gelsäulen

diskontinuierlicher Porengröße

Es wurde versucht, den einstellbaren Molekularsiebeffekt des PAA-Gels zur Abtrennung des Hämoglobins vom Hämoglobin-Haptoglobinkomplex auszunutzen.

Das Molekulargewicht des Hämoglobins beträgt 68×10^3 , seine Abmessungen sind $64 \times 50 \text{ \AA}$. Es handelt sich also um ein ziemlich kompaktes Molekül. Beim Hp 2-2 beträgt das Molekulargewicht 160×10^3 , das Molekulargewicht von Hb-Hp 2-2 liegt bei etwa 230×10^3 . Selbst wenn man die auf den Komplex einwirkende deformierende Kraft des elektrischen Feldes sehr hoch veranschlagt, müßte der Unterschied in den Molekülabmessungen

und im Molekulargewicht doch ausreichen, um bei entsprechender Wahl der Porengröße eine Trennung des Hb von Hb-Hp mittels der dann sehr stark verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit erzielen zu können.

Die Röhren wurden 5 cm hoch mit 10-11% PAA-Gel gefüllt. Darauf kam 0,5 cm hoch normales, 5,5% PAA-Gel, auf welches dann der kleingeschnittene Fleck eingebracht wurde. Nach einer 2-stündigen Elektrophorese bei 4 mA pro Röhre wurde das hochprozentige Gel bis auf ein 0,5 cm langes Stück herausgedrückt und abgeschnitten. Auf die in den Röhren verbleibenden Gelstücke - je 0,5 cm 10% und 5,5% Gel - wurde, nachdem der kleingeschnittene Fleck entfernt worden war, im Anschluß an das 5,5% Gel, normale, 5,5% Monomerenmischung eingefüllt. Nachdem das Gel fest geworden war, wurden die Röhren umgekehrt, d.h. mit dem vorherigen Anodenende, das noch die alten Gelreste enthielt, nach oben zur Kathode hin in das Gerät geschoben und zur Elektrophorese gebracht.

Nach einem 2,5stündigen Lauf bei 5 mA pro Röhre und anschließendem Entwickeln zeigte sich aber, daß das Hb zwar weitgehend abgetrennt war, die Hp-Banden aber nur mehr sehr schwach und in einem geringeren Prozentsatz als oben angegeben nachgewiesen werden konnten.

C. Zusammenfassung

Aufgabe der Arbeit war zunächst, andere Methoden als die bisher allgemein übliche Elektrophorese in Stärkegel auf ihre Brauchbarkeit für die Darstellung der Haptoglobintypen zu prüfen (Zelluloseacetatfolie und Polyacrylamidgel). Dabei zeigte sich sehr schnell, daß die Zelluloseacetatfolie für diesen Zweck unbrauchbar ist, während sich das Polyacrylamidgel hervorragend eignet. Es wurden dann zwei in der Literatur bereits angegebene Verfahrensmethoden der Serumelektrophorese in Polyacrylamidgel nachgearbeitet, die sich als unbefriedigend erwiesen. Daher wurde in zahlreichen einzelnen Arbeitsschritten eine eigene Methodik ausgearbeitet, die schließlich zu einer optimalen, in der Literatur in dieser Qualität noch nicht beschriebenen Darstellung der Haptoglobintypen führte. Es wurde ein eigenes Gerät zur vertikalen Elektrophorese in Polyacrylamidgel und eine eigene Färbeschale entwickelt. Das Verfahren erlaubt, bis zu 13 Fraktionen des Haptoglobintypes 2-1 darzustellen. Es werden detaillierte Arbeitsvorschriften für alle Einzeloperationen angegeben und die Fehlermöglichkeiten erörtert.

Als Anhang wurde die Methode im Vergleich zu einigen anderen Verfahren für den Nachweis der Haptoglobintypen in Blutflecken erprobt. Leider erbrachte auch die Methode in Polyacrylamidgel auf diesem Gebiet keine besseren Ergebnisse als in der Literatur beschrieben.

H. Literatur

- BAUMGARTEN, A.: Micromethod of Haptoglobin Typing Using Acrylamidgels. *Nature* 199, 490, 1963
- BIEL, H., HEIMBURGER, N., KRAFT, D., KRANZ und SCHMIDTBERGER, R.: Einige neuere analytische Methoden zur Charakterisierung der Plasmaproteine. *Behringwerke-Mitt.*, Heft 43, 1, 1964
- CULLIFORD, B.: Haptoglobins and Transferrins in Forensic Bloodstains. *Nature* 198, 796, 1963
- CULLIFORD, B. and WRAXALL, B.: Haptoglobin Types in Dried Bloodstains. *Nature*, 211, 872-873, 1966
- CYANAMID Comp., General Chemical Department, 30 Rockefeller Plaza, New York: CYANOGLUM 41, Gelling Agent for Industrial Use (Prospekt)
- DÜRWARD, W.: Haptoglobinnachweis in Blutflecken. *Acta med. leg.* 16, 67, 1963
- FALK, H. und BUNDSCHUH, G.: Haptoglobine in Blutspuren. *Acta med. leg.* 16, 63, 1963
- FIORI, A. und MARIGO, M.: The Reliability of Gc and Hp Grouping of Bloodstains. 3rd Congr. Pol. For. Med., Abstracts p. 62, Breslau 1965
- GERVAIS, P. et VIESCOU, C.: Les possibilités de l'électrophorèse en gel d'acrylamide pour l'identification des tâches de sang par les groupes d'haptoglobines. *Ann. med. leg.* 45, 244, 1965
- HALLERMANN, W. und STÜRNER, K.: Untersuchungen über die Möglichkeit des Nachweises der Haptoglobintypen in experimentell bereiteten Blutspuren auf Stoffstücken. 41. Kongr. gerichtl. Med. Münster 1962 (pers. Mitt.)
- HALLERMANN, W., KIWI, M. und STÜRNER, K.: Eine immunoelektrophoretische Technik mit kombinierten Puffersystemen zur Darstellung der Haptoglobintypen. *Z. gerichtl. Med.* 54, 839, 1963
- HEIFER, U.: Untersuchung über das Haptoglobin und Methämalbumin in Blut, Blutspuren und Sperma mittels Stärkegelelektrophorese. *Blut* 10, 113, 1964

- JONGKIND, J., WISSE, J. and BLOEMENDAL, H.:
The Effect of Crosslinking on Poly-
acrylamidgel Electrophoresis of -
Cristallin. Prot. of the Biol. Fluids,
Xth Colloquium, Brugge 1952 (Elsevier,
Amsterdam 1962)
- MOLNAR, V.:
Méthodes actuelles dans l'expertise
des tâches de sang. Probl. Med. judic.
drim. (Bukarest) 1, 81, 1964
- MÜNSCHER, F.:
Blindversuche zur ABO-, MN-, Gm- und
Hp-Bestimmung an Blutflecken. Diss.
Marburg 1967
- ORNSTEIN, L.:
Disc electrophoresis I. Ann. N. Y.
Acad. Sci. 121, 321, 1964
- OTT, H. und MARINIS, Sp.: Natürliche und künstliche Polymere
von Plasmaproteinen. Untersuchung an
Acrylamidgel. Prot. of the Biol. Fluids,
XIth Colloquium, Brugge 1964 (Else-
vier, 1964)
- PROKOP, O. und BUNDSCHUH, G.: Die Technik und die Bedeutung
der Haptoglobine in Klinik und Gerichts-
medizin. Berlin (De Gruyter) 1963
- RAYMOND, S. und NAKAMICHI, M.: Electrophoresis in Synthetic
Gels I. Anal. Biochem. 3, 23, 1962
- SMITHIES, O.:
Zone Electrophoresis in Starch Gels.
Group Variation in the Serum Proteins
of Normal Human Adults. Biochem. J.
61, 629, 1955
- VOGEL, G.:
Untersuchung von Blutspurenmaterial.
Kriminalistik 16, 439, 1962
- WHITE, M.:
The Permeability of Acrylamid Polymer
Gel. J. Phys. Chem. 64, 1563, 1960

Ich danke Herrn Professor Schleyer für die Überlassung
des Themas und für die Anregungen während der Arbeit.

LEBENS LAUF

Geboren am 24. März 1937 zu Heilbronn a. N. Aufgewachsen in Klosterreichenbach im Schwarzwald. Besuch der dortigen Volksschule und anschließend der Oberschule in Baiersbronn bis zur Mittleren Reife.

Vom Frühjahr 1954 bis Sommer 1956 zur Ausbildung an der Chemiefachschule Flad in Stuttgart. Anschließend in der Chemischen Industrie als Chemotechniker tätig bis Januar 1960.

Nach einjähriger Vorbereitung Aufnahme in die 9. Klasse des Kepler Gymnasiums in Freudenstadt, wo im Frühjahr 1962 das Abitur abgelegt wurde.

Vom Sommersemester 1962 bis Sommersemester 1965 Medizinstudium in München und vom Wintersemester 1965/66 bis Sommersemester 1967 in Marburg.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

In München die Professoren: Bachmann, Bücher, Büngeler, Dontenwill, Eder, Eyer, Fikentscher, Georgii, Karlson, v. Lanz, Leibbrand, Mai, Marx, Mayet, Merté, Oberrniedermayr, Schuck, Schwiegk, Semm, Wagner, Waidl, Wallraff, Wieland, Wiskott, Zenker.

In Marburg die Professoren: Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Buchholz, Dittrich, Exner, Gedigk, Heuser, Hildebrandt, Jacob, Linneweh, Löhr, Martini, Marx, du Mesnil de Rochemont, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Siess, Straub, Streicher, Siegert

